

<b>THOMSON</b>  <b>DELPHION</b>		<b>RESEARCH</b>	<b>PRODUCTS</b>	<b>INSIDE DELPHION</b>
<a href="#">Top Site</a>	<a href="#">Top Page</a>	<a href="#">Advanced Search</a>	<a href="#">My Account</a>   <a href="#">Products</a>	Search: <a href="#">Quick/Number</a> <a href="#">Boolean</a> <a href="#">Advanced</a> <a href="#">Derwent</a>

## The Delphion Integrated View

Get Now: ☒ PDF | [More choices...](#)

Tools: Add to Work File: [Create new Wor](#)

View: [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#) ☒ Go to: [Derwent](#)

[Email](#)

**Title:** JP4169178A2: BACTERIUM CAPABLE OF PRODUCING HYDROGEN

**Derwent Title:** Hydrogen@-forming bacteria used to treat waste water etc. - are obtd. by suffocating termites, solidifying in agar culture medium, culturing in anaerobic conditions and sepg. formed colony ([Derwent Record](#))

**Country:** JP Japan

**Kind:** A (See also: [JP6085712B4](#))

**Inventor:** TAGUCHI FUMIAKI;  
MORIMOTO MASAYOSHI;  
KYOTANI TAKESHI;  
TAKANO MIKIO;

**Assignee:** TAGUCHI FUMIAKI  
KAJIMA CORP  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

**Published / Filed:** 1992-06-17 / 1990-11-02

**Application Number:** JP1990000295383

**IPC Code:** C12N 1/20; C12P 3/00; C12N 1/20;

**Priority Number:** 1990-11-02 JP1990000295383

**Abstract:** NEW MATERIAL: A bacterium, capable of producing hydrogen gas, derived from termites and having the following properties. Anaerobic Gram-positive bacillus having motility. Proliferating in a bouillon culture medium containing 0.3% glucose added thereto and a gum bouillon culture medium. Biochemical property; positive (+) to glucose, lactose, maltose, salicin, aesculin, cellobiose, mannose and raffinose, negative (-) to indole, urease, gelatin and catalase and partially negative (-) to mannitol, xylose, trehalose, etc.

EXAMPLE: AM14A-2 strain (FERM P-11793).

USE: Production of hydrogen gas, decomposition of organic substances (especially saccharides), etc.

PREPARATION: Termites suffocated to death are solidified in an agar culture medium, cultured in an anaerobic gas atmosphere and separated.

COPYRIGHT: (C)1992, JPO&Japio

**INPADOC Legal Status:** None [Get Now: Family Legal Status Report](#)

**Family:** [Show 2 known family members](#)

**Other Abstract Info:** CHEMABS 117(17)169606X CAN117(17)169606X DERABS C92-253384 DERC92-253384





[Nominate](#)



[this for the Gallery...](#)

© 1997-2004 Thomson

[Research Subscriptions](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [F](#)

## ⑫ 公開特許公報(A)

平4-169178

⑤Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成4年(1992)6月17日  
 C 12 N 1/20 A 7236-4B  
 // C 12 P 3/00 Z 8114-4B  
 (C 12 N 1/20  
 C 12 R 1:145)  
 (C 12 P 3/00  
 C 12 R 1:145)

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全20頁)

⑭発明の名称 水素ガス産生細菌

⑯特 願 平2-295383

⑰出 願 平2(1990)11月2日

⑱発明者 田 口 文 章 神奈川県相模原市陽光台5-14-1  
 ⑱発明者 森 本 昌 彦 東京都調布市飛田給2丁目19番1号 鹿島建設株式会社技術研究所内  
 ⑱発明者 京 谷 健 東京都港区元赤坂1丁目2番7号 鹿島建設株式会社内  
 ⑱発明者 鷹 野 幹 雄 東京都調布市飛田給2丁目19番1号 鹿島建設株式会社技術研究所内  
 ⑲出願人 田 口 文 章 神奈川県相模原市陽光台5-14-1  
 ⑲出願人 鹿島建設株式会社 東京都港区元赤坂1丁目2番7号  
 ⑲代理人 弁理士 戸田 親男

## 明 細 書

## (背景技術)

1. 発明の名称 水素ガス産生細菌

2. 特許請求の範囲

- 1) クロストリジウム属に属する水素ガス産生細菌。
- 2) 別掲表1-1、表1-2、表1-3に記載された一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス産生細菌。
- 3) AM14A-2株(農工研菌寄第11793号)、AM37E株(同、第11794号)、AM21B株(同、第11795号)、AM9A-2株(同、第11800号)、AM37F株(同、第11799号)、AM40A株(同、第11798号)、AM18B株(同、第11796号)、AM38C-1株(同、第11797号)およびAM42E株(同、第11801号)より選抜される水素ガス産生細菌。

3. 発明の詳細な説明

## (技術分野)

本発明は、水素ガスの産生菌に関するものであり、詳しくは、シロアリより単離された新規な水素ガス産生菌を提供するものである。

現代工業社会においては、石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料が大量に消費され、その化石燃料は、燃焼により多量のNO<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub>およびCO<sub>2</sub>などを排出し、その結果、環境汚染、酸性雨、地球の温暖化などの諸問題を惹起している。更には、その埋蔵量が有限で近い将来枯渇するといわれ、重要な社会問題ともなっている。

これらのことから、化石燃料に代わる環境汚染のない新しいクリーンなエネルギー源が世界的に求められており、石油に代わる次世代のエネルギー源として、現在、アルコール及びメタンガスが注目されている。しかし、アルコールやメタンガスは、いずれも燃焼により大量にCO<sub>2</sub>を産生する点では、依然として問題があり、しかも、その内在エネルギーはロケットや航空機用の燃料に使用し得るほど高いものではないという欠点を有している。

ところで、水素ガスは、単位重量当りの燃焼による発熱エネルギーが石油の3倍もあり、し

かも、燃焼による副生物が $H_2O$ のみであることから、次世代の理想的なクリーンエネルギー源として期待されている。

しかしながら、現状での水素ガスの工業的製法は、水の電気分解や液化プロパン (LPG)、アルコールの高圧熱分解などの方法によっているため、これらの方法は、そのエネルギー源として化石燃料を消費するものであるから、製造法におけるエネルギー源の問題が解決されない限り前述した環境汚染などの諸問題の基本的解決にはならない。

これまで、微生物による水素ガスの産生に関する研究が試みられている。微生物により水素ガスを生産するという方法が確立されたとすればその方法の利点は、反応が常温、常圧で行なわれるから、システム組成が簡単であり、また、エネルギー消費も極めて少ないということであり、しかも、再生可能なバイオマスを水素ガス産生の原料として使用するものであって、このバイオマスはもともと太陽エネルギーを交換し

たものである。更に言えば、微生物による水素ガスの産生には、通常、廃棄物または廃液中に存在する有機物質を原料とすることが可能であるので、環境浄化の問題の解決にもなるという利点がある。

このように微生物による水素ガスの産生は、水素ガスの製造方法として、極めて優れた利点を有してはいるが、従来の研究業績においては、未だそれを工業的な製造方法として確立するにはほど遠い状況にある。特に、これまでに行われている研究では、工業的な生産を可能にするほどの水素ガスの生産性の高い微生物は見出されておらず、したがって、現状では微生物を利用して水素ガスを工業的に製造する方法については、全く未開発の状況にある。

これまでに知られている、水素ガスを産生する微生物は、大別すると、光合成微生物と非光合成細菌とに分けられる。前者には、光合成細菌の *Rhodobacter sphaeroides*、藍藻の *Oscilla-*

*toria* sp. Miani BG7があり、後者には、窒素固定細菌の *Azotobacter chroococcum*、*Klebsiella pneumonia*、通性嫌気性細菌の *Escherichia coli*、*Enterobacter aerogenes*、嫌気性細菌の *Clostridium butyricum* 等がある。

光合成微生物による水素ガスの産生には、光エネルギーを利用するために、表面積の広い培養槽と多量の水を必要とする。

他方、非光合成細菌による水素ガスの産生は、小規模の発酵槽によっても可能であり、地下に設置するなど、その設置場所の選択肢が広いなどの利点があり、水素ガスの産生には、非光合成細菌による方が光合成微生物によるよりも有利であると考えられている。

現在までに単離された微生物のなかで、最も効率よく水素ガスを産生する微生物は、Tanisho S.らが単離したエンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) E82005株であるとされている (Tanisho S., et al. *Int. J. Hydrogen Energy* 12 623, 1987; *Biochim. Biophys.*

*Acta*, 973 1 1989)。しかし、この菌株は、通性嫌気性細菌であり、嫌気状態でも増殖するが、好気性条件下でより活発に増殖するため、発酵槽内で大量の水素が産生されると、槽内を好氣的に維持することが困難になり、水素ガスの工業的生産には適さない。

#### (発明の開示)

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、水素ガス産生細菌を過去試みられたことのない昆虫に求め、シロアリ (*Termites formosans*) より、極めて反応速度の速く、かつ大量の水素ガスを産生する新規な細菌を単離することに成功した。

すなわち、本発明は、

- 1) クロストリジウム属に属する水素ガス産生細菌。
- 2) 別掲表1-1、表1-2、表1-3に記載された一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス産生細菌。
- 3) AM14A-2株、AM37E株、AM21B株、AM9A-2株、

AN37F株、AN40A株、AN18B株、AN38C-1株およびAN42E株より選択される水素ガス産生細菌を提供するものである。

上記のAN14A-2株、AN37E株、AN21B株、AN9A-2株、AN37F株、AN40A株、AN18B株、AN38C-1株およびAN42E株は、工業技術院微生物工業研究所において、微工研菌寄第11793号、同、第11794号、同、第11795号、同、第11800号、同、第11799号、同、第11798号、同、第11796号、同、第11797号および同、第11801号として寄託されている。

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明者らは、イエシロアリ(Termites formosans)を生きた状態のままで窒息死させ、後に詳述する操作を経て、嫌気性細菌を分離した。細菌の分離培養用培地として普通ブイヨン(日水製薬株式会社製)を通常の50分の1に希釈した培養液(以下1/50Nと略記する)にメタンガスの基質である酢酸ソーダと水素ガスの基質であ

る硫酸ソーダとをそれぞれ2.5g/2づつ加えて調製した培養液(以下1/50N\*と略記する)を考察して用いた。また、この1/50N\*に1.5%の固形物を加えた養分1/50N\*察天培地を創製した。次に培養条件として、将来エネルギー回収型の腐敗処理にも応用することを考慮し、35℃での嫌気性培養を用いることにした。

イエシロアリから嫌気性細菌を効率よく分離培養するために、板力酸菌との接触を避けることに留意し、そのために、巣より取り出した生きているイエシロアリのベトリ皿に入れ、それを嫌気性培養器(グローブボックス、米田フオーマ社製)内に納め、嫌気性混合ガス(H<sub>2</sub> 10%、CO<sub>2</sub> 10%、N<sub>2</sub> 80%)の雰囲気下で窒息死させた。このイエシロアリをすりつぶすことなく、シロアリ10匹を1/50N\*察天培地20mlに加え、充分に混和して固化した。この操作によって、シロアリが察天中に埋設した状態となり混合ガスにもあまり接触しない条件が作り出された。

この察天平板10枚を嫌気性混合ガスの雰囲気

下で35℃で3週間培養を行った。

次いで、細菌学的な分離操作により153株の細菌を単離し、その153株の細菌の水素ガス産生能をスクリーニング法により検定した結果、93%に相当する141株が水素ガスを産生することが見出された。次いで酸素要求性試験を行った結果、8株が通性嫌気性細菌であった。最終的には、目的に合う候補菌37株の分離に成功した。

現在までに分離された微生物のなかで、最も効率よく水素ガスを産生する微生物は、前述したとおり、Enterobacter aerogenes E82005株とされているが、この菌株は11ml H<sub>2</sub>/4-medium・hr又は246ml H<sub>2</sub>/4-medium・hrの水素ガスを産生するのに対し、本発明者が単離した菌株のうち、9株は、これをはるかに超える水素ガス産生能を有する。

これら9株の一般的性状、生化学的性状、酵素活性を表1-1、表1-2及び表1-3に示す。

表 1-2 生化学的性状

イ	菌 株 名									
	AN14A-2	AN18B	AN38C-1	AN37E	AN9A-2	AN40A	AN37F	AN21B	AN42E	
インドール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
クレアーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブドウ糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マンニット	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
乳 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
サリシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
キシロース	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
アラビノース	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
ゼラチン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エスクリン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
グリセリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マンノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
メレジトース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ソルビット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
トレハロース	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 1-1 一般的性状

性 状	菌 株 名 <sup>*)</sup>									
	(イ)	(ロ)	(ハ)	(ニ)	(ホ)	(ヘ)	(ト)	(チ)	(リ)	
グラム染色 <sup>*)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
形 態 <sup>*)</sup>										
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
芽 胞 <sup>*)</sup>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
集落の大きさ(μm)	3~5	5	3~5	5	3~5	5	3	3~5	3~5	3~5
酸素要求性 <sup>*)</sup>										
増殖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/50N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/50N <sup>*)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N <sup>*)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N <sup>o</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*) + はグラム陽性

\*) 2 : すべて桿菌である

\*) 3 : + は芽胞陽性

\*) 4 : すべて嫌気性である

\*) 5 : (イ)はAN14A-2

(ロ)はAN37E

(ハ)はAN21B

(ニ)はAN9A-2

(ホ)はAN37F

(ヘ)はAN40A

(ト)はAN18B

(チ)はAN38C-1

(リ)はAN42E

表 1-3 酵素活性

菌株名	URE	BLTS	aARA	ONPG	aGLU	BGLU	aGAL	aFUC	NAG	PO4	LGY	GLY	PRO	PAL	ARG	SER	PYR	IND
AM9A-2	-	-	=	=	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM38C-1	-	-	=	=	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM40A	-	-	=	=	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM37F	-	-	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM42E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM14A-2	-	-	=	+	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM21B	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM37E	-	-	-	+	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM18B	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Rap ANA II System

(Substance)

URE	Urea
BLTS	p-Nitrophenyl-B, D-disaccharide
aARA	p-Nitrophenyl-a, L-arabinoside
ONPG	o-Nitrophenyl-B, D-galactoside
aGLU	p-Nitrophenyl-a, D-glucoside
BGLU	p-Nitrophenyl-B, D-glucoside
aGAL	p-Nitrophenyl-a, D-galactoside
aFUC	p-Nitrophenyl-a, L-fucoside
NAG	p-Nitrophenyl-N-acetyl-B, D-glucosaminide
PO4	p-nitrophenylphosphate
LGY	Leucyl-glycine-B-naphthylamide
GLY	Glycine-B-naphthylamide
PRO	Proline-B-naphthylamide
PAL	Phenylalanine-B-naphthylamide
ARG	Arginine-B-naphthylamide
SER	Serine-B-naphthylamide
PYR	Pyrrolidonyl-B-naphthylamide
IND	Tryptophane

(Enzyme activities)

β-Galactosidase
α-Glucosidase
β-Glucosidase
α-Galactosidase
α-Fucosidase
N-Acetylglucosaminidase
Alkaline-phosphatase
Leucylglycine aminopeptidase
Glycine aminopeptidase
Proline aminopeptidase
Phenylalanine aminopeptidase
Arginine aminopeptidase
Serine aminopeptidase
Pyrrolidone aminopeptidase
Tryptophanase(indole production)

注: ⊕印は極めて強い

これらの各菌株の性状 (API 20A, Rap ANA II systemによる) より、AM21Bは*Clostridium beijerinckii*、AM37EとAM14A-2は*Clostridium butyricum*と同定された。AM38C-1、AM42E及びAM18Bの3菌株は*Clostridium*属と考えられるが、これまで知られていない新規な細菌である。さらに、AM37F、AM9A-2及びAM40Aの3株は、同定不能な全く新しい水素産生菌である。更に詳細に言えば、AM37F、AM9A-2及びAM40Aのように、グラム陽性、桿菌、無芽胞性嫌気性細菌で水素ガスを産生する細菌については、これまで全く報告されておらず、例をみないものである。これらの3菌株は、世界で初めて見出された細菌である。

これら菌株のガム瘻天の高層斜面培地におけるガス産生性能を表1-4に示す。

表 1-4

ガム瘻天の高層斜面培地におけるガス産生能

菌株名	肝気培養		遊気培養	
	増殖	ガス産生	増殖	ガス産生
AM 9A-2	-	-	+	+
AM 14A-2	-	+	+	+
AM 18B	-	+	+	+
AM 21B	-	+	+	+
AM 37E	-	+	+	+
AM 37F	-	+	+	+
AM 38C-1	-	+	+	+
AM 40A	-	+	+	+
AM 42E	-	+	+	+

ガム瘻天の高層斜面培地を用いて36℃24時間培養

また、人工汚水におけるガス産生能を表1-5に示す。

表1-5

人工汚水によるガス産生能

菌株名	人工汚水*							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
AM 9A-2	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 14A-2	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 18B	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 21B	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 37E	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 37F	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 38C-1	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 40A	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 42E	-	±	+	±	+	+	+	+

\*

- (1) N: 普通ブイヨン(日本製薬製)  
 (2) NY: 0.5% イーストエキストラクト(日本製薬製)加N  
 (3) NY: 0.3% グルコース加N  
 (4) PY: 0.5% ペプトンとイーストエキストラクト  
 (5) PYG: 1% グルコース加PY  
 (6) PYS: 1% 酵母粉加PY  
 (7) GAM: ガムブイヨン(日本製薬製)  
 (8) K-meet: クラウドミート培地(日本製薬製)

+は、ガス産生量がダーラム管の $\frac{1}{2}$ 程度  
 ±は、ガス産生量がダーラム管の $\frac{1}{4}$ 程度

ガス産生量の測定は、添付図面第1図に示す装置を用いて行った。

すなわち、培養ビンの口を密栓したゴム栓に18号注射針を刺し通し、そこにビニールチューブをつなぎ、この排気管をガス測定用シリンダーに接続した。培養後、逆さにしたシリンダーに溜まったガス産生量を測定した。

前記したとおり、Enterobacter aerogenes E 82005株の水素ガス産生能は $246 \text{ ml/g} \cdot \text{hr}$ であるのに対し、本発明者がイエシロアリより分離に成功した前記の9菌株の水素産生能は、表1-6に示すようにE82005株と比較して全く比較にならないほど大量の水素ガスを産生する。

表1-6 水素ガス産生能

菌株名	水素ガス産生能 ( $\text{ml H}_2/\text{g} \cdot \text{hr}$ )	
E. aerogenes E82005	246	1.0
AM37F	2,790	11.3
AM21B	2,515	10.2
AM38C-1	2,396	9.7
AM42E	2,380	9.7
AM18B	1,898	7.7
AM37E	1,815	7.4
AM9A-2	1,501	6.1
AM14A-2	1,478	6.0
AM40A	759	3.1

次に、上記の9菌株の糖分解能と糖分解系酵素活性をみると、非常に多様な活性を有していることが判明した(表1-2、表1-3参照)。

特にAM9A-2、AM37F、AM14A-2及びAM37Eの4株の $\alpha$ -glucosidase活性及び $\alpha$ -galactosidase活性は極めて強力であることが判明した。これ

らの研究結果よりみて、糖を成分とする天然物をはじめ、例えばパルプ植物繊維、澱粉あるいは多糖類などを含む廃液を処理するにあたって、これらの菌株は特に有効な細菌株であるということができ、廃液・廃棄物の処理による環境浄化やあるいは、水素ガスの製造の工業化においてこれらの菌株は極めて重要な役割を果たすものである。

本発明者の見出した新規な水素ガス産生菌は、極めて速い反応速度で、かつ時間あたり極めて大量の水素ガスを産生するという画期的な特徴的性格を有するものであり、食品工業・製紙工業などに由来する廃水、あるいは生活廃水あるいはあらゆる有機物質含有廃棄物などの処理にとって極めて有効な細菌である。

次に本発明の実施例を示す。

## 実施例1

グルコースをそれぞれ、0.3%及び1.0%加えた普通ブイヨン(日本製薬製)にAM21B菌を接種し、第1図に示す装置を用いて、36℃の水槽で



培養し、発生する水素ガスの量を1時間毎に測定した。結果は表1-7に示すとおりであった。

表1-7 ガス発生量 (ml)

培養時間 (hr)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	総計
1%グルコース イオン	0	0	0	170	425	605	520	425	350	270	230	150	3145
0.3%グルコース イオン	0	0	0	10	125	130	270	495	240	50	30	0	1350

#### 実施例2 人工汚水からの水素ガスの発生

0.3%グルコース加普通ブイヨン(日水製薬製)とガムブイヨン培地(日水製薬製)の各300mlに各菌を接種して、36℃で1液静置培養した。産生されたガス量と水素ガス濃度より水素ガス産生量を算出した。結果は表1-8に示すとおりであった。

表 1-8

菌株名	ガス産生量(ml)		C/N <sup>o</sup>	ガス組成(%)		産生量(ml)		H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
	C培地	N <sup>o</sup> 培地		H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	
AM38C-1	770	365	2.1	51.1	26.2	393	201	2.0
AM18B	860	360	2.4	40.2	19.9	357	171	2.2
AM9A-2	640	320	2.0	46.7	26.5	299	170	1.8
AM37F	730	355	2.0	40.7	18.0	297	131	2.3
AM37E	640	330	1.9	38.6	22.1	285	143	2.0
AM42E	630	250	2.5	44.4	16.2	280	102	2.8
AM21B	750	145	5.2	37.5	17.9	281	134	2.1
AM40A	600	230	2.6	42.5	21.7	255	130	2.0
AM14A-2	450	110	4.1	44.6	19.6	200	88	2.3

#### 実施例3 新規な水素ガス産生菌による水素ガス産生

人工汚水としてのガムブイヨン(日水製薬製)培地900mlに各培養菌液100mlを添加し攪拌して培養した。1時間毎にガス産生量、菌量(OD)、pH及び糖濃度を測定し、ガス産生量が200ml以上の場合のガスの組成分析を行った。ガス産生量とガス濃度から、水素ガスの産生量を算出し、培養時間と水素ガス産生量の関係を検討した。

表1-9はその結果を示すものである。

表 1 - 9

	培養時間 (h)	ガス 発生量 (ml)	ガス組成(%)		発生量(ml)		固 置 (OD)	pH	糖濃度 (mg/dl)
			H <sub>2</sub> 量	CO <sub>2</sub> 量	H <sub>2</sub> 量	CO <sub>2</sub> 量			
AM218	0	0	—	—	—	—	0.30	6.86	300
	1	110	—	—	—	—	0.83	6.61	226
	2	340	34.3	5.8	116	20	1.60	6.35	90
	3	740	50.4	8.1	373	60	2.64	5.82	53
	4	1280	63.5	22.4	762	269	3.68	5.49	18
	5	800	45.2	27.9	362	223	4.33	5.40	18
	6	200	28.2	49.9	56	100	4.40	5.37	14
	Total	3390	—	—	1669	672	—	—	—
AM38C-1	0	0	—	—	—	—	0.46	6.81	300
	1	310	38.7	12.3	120	38	0.92	6.39	238
	2	900	52.0	21.0	468	189	1.60	5.71	94
	3	1200	60.1	30.8	726	370	3.00	5.32	45
	4	470	42.2	30.7	198	144	3.20	5.24	45
	5	70	—	—	—	—	3.20	5.24	45
	6	60	—	—	—	—	3.20	5.24	45
	Total	3010	—	—	1512	741	—	—	—
AM37F	0	0	—	—	—	—	0.59	6.81	300
	1	120	—	—	—	—	1.26	6.52	176
	2	580	53.1	25.6	308	148	2.73	5.76	50
	3	1440	56.6	34.1	815	491	3.80	5.30	30
	4	380	52.8	31.9	201	121	4.38	5.07	30
	5	180	—	—	—	—	4.38	5.07	30
	6	60	—	—	—	—	4.38	5.07	30
	Total	2760	—	—	1324	760	—	—	—

表 1 - 9 (続)

	培養時間 (h)	ガス 発生量 (ml)	ガス組成(%)		発生量(ml)		固 置 (OD)	pH	糖濃度 (mg/dl)
			H <sub>2</sub> 量	CO <sub>2</sub> 量	H <sub>2</sub> 量	CO <sub>2</sub> 量			
AM14A-2	0	0	—	—	—	—	0.49	6.62	300
	1	210	31.4	8.1	66	16	0.94	6.24	246
	2	760	56.3	20.7	428	157	1.84	5.50	106
	3	860	52.1	30.9	448	266	2.64	5.33	54
	4	770	32.7	20.6	252	157	2.64	5.10	45
	5	80	—	—	—	—	2.64	5.10	45
	6	20	—	—	—	—	2.64	5.10	45
	Total	2750	—	—	1194	596	—	—	—
AM42E	0	0	—	—	—	—	0.64	6.76	300
	1	120	—	—	—	—	1.32	6.46	240
	2	560	45.3	25.9	227	145	2.92	5.86	100
	3	1060	69.4	26.2	721	258	4.46	5.37	23
	4	560	40.6	24.4	127	137	5.00	5.21	23
	5	280	38.4	15.6	108	44	5.00	5.16	20
	6	110	—	—	—	—	5.00	5.16	20
	Total	2630	—	—	1183	584	—	—	—

表 1 - 9 (続)

	培養時間 (h)	ガス 発生量 (ml)	ガス組成(%)		発生量(ml)		固 置 (OD)	pH	糖濃度 (mg/dl)
			H <sub>2</sub> 量	CO <sub>2</sub> 量	H <sub>2</sub> 量	CO <sub>2</sub> 量			
AM9A-2	0	0	—	—	—	—	0.52	6.73	300
	1	180	—	—	—	—	1.26	6.42	210
	2	370	46.3	15.9	170	59	2.73	5.83	90
	3	450	53.1	26.3	239	118	3.28	5.59	50
	4	850	53.6	32.3	455	275	3.84	5.27	30
	5	360	48.0	31.4	173	113	3.84	5.20	30
	6	330	32.8	30.1	108	99	3.84	5.20	30
	Total	2540	—	—	1145	664	—	—	—
AM18B	0	0	—	—	—	—	0.42	6.76	300
	1	80	—	—	—	—	0.68	6.64	290
	2	280	29.7	6.2	130	56	1.68	5.83	218
	3	530	50.7	28.7	267	152	2.37	5.47	134
	4	1100	52.3	33.4	575	367	2.70	5.21	74
	5	410	45.8	34.9	188	102	2.80	5.17	68
	6	140	—	—	—	—	2.80	5.14	62
	Total	2540	—	—	1160	617	—	—	—

表 1 - 9 (続)

	培養時間 (h)	ガス 発生量 (mL)	ガス組成(%)		発生量(mL)		菌量 (OD)	pH	菌濃度 (mg/L)
			H <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)			
AH10A	0	0	—	—	—	—	0.26	6.81	300
	1	90	—	—	—	—	0.84	6.50	224
	2	310	40.5	11.3	126	35	2.08	5.73	70
	3	510	48.1	29.4	245	150	2.84	5.26	60
	4	440	51.6	29.7	230	131	3.10	5.12	40
	5	390	52.2	27.1	158	94	3.28	5.12	36
	6	280	33.4	24.1	94	76	3.28	5.12	36
	Total	2020	—	—	853	486	—	—	—
AH37E	0	0	—	—	—	—	0.78	6.73	300
	1	20	—	—	—	—	1.15	6.43	240
	2	80	—	—	—	—	2.00	5.95	145
	3	390	37.3	20.2	160	87	3.20	5.31	115
	4	1200	43.0	20.3	550	259	4.24	5.04	95
	5	210	33.1	24.6	56	42	4.24	5.01	85
	6	20	—	—	—	—	4.32	5.01	80
	Total	2000	—	—	766	388	—	—	—

以上、述べたところから明らかなように、本発明に係る新規な水素ガス産生菌は、水素ガスの工業的製造法あるいは廃水処理、廃棄物処理に有用な優れた活性を有し、産業上極めて価値ある微生物である。

## 4. 図面の簡単な説明

添付第1図は、本発明に係る新規微生物のガス発生量を測定するために使用した装置の1例を示すものである。

特許出願人 田 口 文 章

特許出願人 鹿島建設株式会社

代理人 弁理士 南 孝 夫

代理人 弁理士 川 上 宣 男

## 手続補正書

平成 3年 6月 5日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成 2年 特許願 第295383号

## 2. 発明の名称

水素ガス産生菌

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 神奈川県相模原市陽光台5-14-1

氏 名 田 口 文 章 (ほか1名)

## 4. 代 理 人

住 所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号

邦楽ビル503

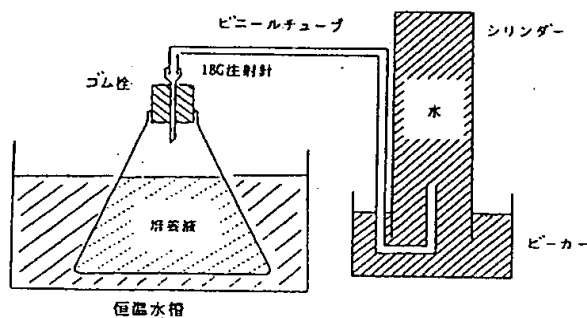
氏 名 弁理士(7577) 戸 田 親 男

電話 3508-0333

## 5. 補正により増加する請求項の数

4

第 1 図



## 6. 補正の対象

発明の名称及び明細書

## 7. 補正の内容

- (1) 発明の名称を『 水素ガス産生菌 』と補正する。
- (2) 明細書全文を別紙のとおり補正する。

## 1. 発明の名称

水素ガス産生菌

## 2. 特許請求の範囲

- 1) シロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 2) 窒息死せしめたシロアリを寒天培地で固化した後これを嫌気性ガス雰囲気下で培養し、それから分離して得たことを特徴とする、請求項1のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 3) シロアリがイエシロアリ (*Termites formosans*) であり、寒天培地が酢酸塩及びギ酸塩を含有することを特徴とする、請求項2のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 4) クロストリジウム (*Clostridium*) 属に属するものであることを特徴とする、請求項1のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 5) クロストリジウム (*Clostridium*) 属の菌学的性質を有するが芽胞形成能を欠くことを特徴とする微生物群に属する水素ガス産生菌。
- 6) 別掲表1-1、表1-2、表1-3に記載さ

れた一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス産生細菌。

- 7) AM14A-2株(微工研菌寄第11793号)、AM37E株(同、第11794号)、AM21B株(同、第11795号)、AM9A-2株(同、第11800号)、AM37F株(同、第11799号)、AM40A株(同、第11798号)、AM18B株(同、第11796号)、AM38C-1株(同、第11797号)およびAM42E株(同、第11801号)より選択される水素ガス産生細菌。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用の分野〕

本発明は、微生物、特に水素ガスの産生菌に関するものであり、詳しくは、シロアリより単離された新規な水素ガス産生菌を提供するものである。

本発明に係る微生物は、水素ガス産生能にすぐれているので、水素ガスの工業生産に有用であり、したがって本発明は、エネルギーの技術分野において大きな貢献をなすものであるが、そのうえ更に、本発明に係る微生物は、各種の糖を広範に且つ強力に分解する能力も併有しているので、食品

工業や製紙工業由来の廃水や生活廃水等特に糖類を多量に含有する廃水の処理に有用であり、廃水処理ないし公害防止の技術分野においても多大の貢献をなすものである。

〔従来の技術〕

現代工業社会においては、石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料が大量に消費され、その化石燃料は、燃焼により多量の  $\text{NO}_x$ 、 $\text{SO}_x$  および  $\text{CO}_2$  などを排出し、その結果、環境汚染、酸性雨、地球の温暖化などの諸問題を惹起している。更には、その埋蔵量が有限で近い将来枯渇するといわれ、重要な社会問題ともなっている。

これらのことから、化石燃料に代わる環境汚染のない新しいクリーンなエネルギー源が世界的に求められており、石油に代わる次世代のエネルギー源として、現在、アルコール及びメタンガスが注目されている。しかし、アルコールやメタンガスは、いずれも燃焼により大量に  $\text{CO}_2$  を発生する点では、依然として問題があり、しかも、その内在エネルギーはロケットや航空機用の燃料に使用

し得るほど高いものではないという欠点を有している。

そこで、水素ガスが注目されるようになった。水素ガスは、単位重量当りの燃焼による発熱エネルギーが石油の3倍もあり、しかも、燃焼による副生物が $H_2O$ のみであることから、次世代の理想的なクリーンエネルギー源として期待されるからである。

しかしながら、現状での水素ガスの工業的製法は、水の電気分解や液化プロパン (LPG)、アルコールの高圧熱分解などの方法によっているため、これらの方法は、そのエネルギー源として化石燃料を消費するものであるから、製造法におけるエネルギー源の問題が解決されない限り前述した環境汚染などの諸問題の基本的解決にはならない。

そこで微生物が着目され、微生物による水素ガスの産生に関する研究がいくつか試みられてきた。たしかに、微生物により水素ガスを生産するという方法が確立されるとすれば、その方法の利点は、反応が常温、常圧で行なわれるから、システム構

*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*、嫌気性細菌の *Clostridium butyricum* 等がある。

たしかに、このように微生物による水素ガスの産生は、水素ガスの製造方法として、極めて優れた利点を有してはいるが、従来の研究業績においては、未だそれを工業的な製造方法として確立するにはほど遠い状況にある。特に、これまでに行われている研究では、工業的な生産を可能にするほどの水素ガスの生産性の高い微生物は見出されておらず、したがって、現状では微生物を利用して水素ガスを工業的に製造する方法については、全く未開発の状況にある (福井三郎ほか監修「バイオテクノロジー事典」(株)シーエムシー(1986-10-9) p.601-602)。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記のように微生物による水素ガスの産生技術は、未だ工業的レベルにまでは達していない。

従来既知の微生物は、いずれも、水素ガスの産生効率自体が低だけでなく、これらの微生物の内、光合成微生物については、それによる水素ガ

成が簡単であり、また、エネルギー消費も極めて少ないということであり、しかも、再生可能なバイオマスを水素ガス産生の原料として使用するものであって、このバイオマスはもともと太陽エネルギーを変換したものであるので自然エネルギーの有効利用であることになる。更にまた、微生物による水素ガスの産生には、通常、廃棄物または廃液中に存在する有機物質を原料とすることが可能であるので、廃液の効率的処理による環境浄化の問題の解決にもなるという利点がある。

上記のように微生物による水素ガスの産生に関する研究がいくつか行われた結果、水素ガスを産生する微生物が若干発見された。

これらのこれまでに知られている、水素ガスを産生する微生物は、大別すると、光合成微生物と非光合成細菌とに分けられる。前者には、光合成細菌の *Rhodobacter sphaeroides*、藍藻の *Oscillatoria* sp. Miami BG7 があり、後者には、窒素固定細菌の *Azotobacter chroococcum*, *Klebsiella pneumonia*、通性嫌気性細菌の

スの産生には、光エネルギーを利用するために、表面積の広い培養槽と多量の水を必要とする。

他方、非光合成細菌による水素ガスの産生は、小規模の発酵槽によっても可能であり、地下に設置するなど、その設置場所の選択が広いなどの利点があり、水素ガスの産生には、非光合成細菌による方が光合成微生物によるよりも有利であると考えられる。

現在までに単離された微生物のなかで、最も効率よく水素ガスを産生する微生物は、Tanisho S. らが単離したエンテロバクター アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) E82005 株であるとされている (Tanisho S., et al. Int. J. Hydrogen Energy 12 623, 1987; Biochim. Biophys. Acta. 973 1 1989)。しかし、この菌株は、通性嫌気性細菌であり、嫌気状態でも増殖するが、好気性条件下でより活発に増殖するため、発酵槽内で大量の水素が産生されると、槽内を好氣的に維持することが困難になり、水素ガスの工業的産生には適さない。

本発明の目的は、工業的生産に好適な水素ガス産生菌を新たに開発するとともに、廃水、特に糖類に富む廃水を効率よく処理しうる微生物を新たに開発することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、各方面から鋭意検討したにもかかわらず成功するには至らず、目的を達成しうる微生物をスクリーニングするには、従来からの発想を大転換する必要があることを認めた。

そこで、微生物の起源について本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、水素ガス産生細菌の起源を過去試みられたことのない昆虫に求め、遂にシロアリ (*Termites formosans*) より、極めて反応速度が速く、かつ大量の水素ガスを産生する新規な細菌を単離することに成功した。そして更に驚くべきことに、これらの微生物は糖を分解する能力が非常に高いことも併せ確認し、これらの有効な新知見を基礎として本発明が完成されたのである。すなわち本発明は、シロアリ、つまり等翅目、

れた一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス産生細菌。

7) AM14A-2株、AM37E株、AM21B株、AM9A-2株、AM37F株、AM40A株、AM18B株、AM38C-1株およびAM42E株より選択される水素ガス産生細菌。を提供するものである。

上記のAM14A-2株、AM37E株、AM21B株、AM9A-2株、AM37F株、AM40A株、AM18B株、AM38C-1株およびAM42E株は、工業技術院微生物工業研究所において、微工研菌寄第11793号、同、第11794号、同、第11795号、同、第11800号、同、第11799号、同、第11798号、同、第11796号、同、第11797号および同、第11801号としてそれぞれ寄託されている。

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明を実施するには、まずシロアリから嫌気性菌を分離する必要がある。それには、例えばイエシロアリ (*Termites formosans*) を生きた状態のままで窒息死させ、酢酸塩及びギ酸塩 (塩としてはアルカリ (土) 金属塩が好適) を含有する分離用培地を用いて目的とする微生物を分離する。

シロアリ科 (*Termitidae*) に属する昆虫由来の水素ガス産生菌に関する発明を基本的技術思想とするものである。

更に詳細には、本発明は、

- 1) シロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 2) 窒息死せしめたシロアリを寒天培地で固化した後これを嫌気性ガス野囲気下で培養し、それから分離して得たことを特徴とする第1) 項のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 3) シロアリがイエシロアリ (*Termites formosans*) であり、寒天培地が酢酸塩及びギ酸塩を含有することを特徴とする第2) 項のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 4) クロストリジウム (*Clostridium*) 属に属するものであることを特徴とする第1) 項のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 5) クロストリジウム (*Clostridium*) 属の菌学的性質を有するが芽胞形成能を欠くことを特徴とする微生物群に属する水素ガス産生菌。
- 6) 別掲表1-1、表1-2、表1-3に記載さ

例えば、本発明者らは、細菌の分離培養用培地として、普通ブイヨン (日水製薬株式会社製) を通常の50分の1に希釈し培養液 (以下1/50Nと略記する) にメタンガスの基質である酢酸ソーダと水素ガスの基質である蟻酸ソーダとをそれぞれ2.5g/2づつ加えて調製した培養液 (以下1/50N<sup>+</sup>と略記する) を考案して用いた。また、この1/50N<sup>+</sup>に1.5%の割に寒天を加えた貧栄養1/50N<sup>+</sup>寒天培地を創案した。次に培養条件として、将来エネルギー回収型の廃液処理にも応用することを考慮し、35℃での嫌気性培養を用いることにした。

イエシロアリから嫌気性細菌を効率よく分離培養するために、極力酸素との接触を避けることに留意し、そのために、果より取り出した生きているイエシロアリをペトリー皿に入れ、それを嫌気性培養器 (グローブボックス、米国フォーマ社製) 内に納め、嫌気性混合ガス (H<sub>2</sub> 10%、CO<sub>2</sub> 10%、N<sub>2</sub> 80%) の野囲気下で窒息死させた。このイエシロアリをすりつぶすことなく、シロアリ10匹を1/50N<sup>+</sup>寒天培地20mlに加え、充分に混和して固化

させた。この操作によって、シロアリが寒天中に埋設した状態となり混合ガスにもあまり接触しない条件が作り出された。

この寒天平板10枚を嫌気性混合ガスの昇気管下で35℃で3週間培養を行った。

次いで、細菌学的な分離操作により153株の細菌を単離し、その153株の細菌の水素ガス産生能をスクリーニング法により検定した結果、93%に相当する141株が水素ガスを産生することが見出された。次いで酸素要求性試験を行った結果、8株が通性嫌気性細菌であった。最終的には、目的に合う候補菌37株の分離に成功した。

現在までに分離された微生物のなかで、最も効率よく水素ガスを産生する微生物は、前述したとおり、*Enterobacter aerogenes* E82005株とされているが、この菌株は11mmol H<sub>2</sub>/2-medium.hr又は246mmol H<sub>2</sub>/2-medium.hrの水素ガスを産生するのに対し、後記するところからも明らかなように本発明者が単離した菌株のうち、9株は、これをはるかに超える水素ガス産生能を有する点できわ

めて特徴的である。

これら9株の一般的性状、生化学的性状、酵素活性を表1-1、表1-2及び表1-3に示す。

表1-1 一般的性状

性 状	菌 株 名								
	(イ)	(ロ)	(ハ)	(ニ)	(ホ)	(ヘ)	(ト)	(チ)	(リ)
グラム染色*1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
形態*2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+
芽胞*3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
集落の大きさ*4	3~5	5	3~5	5	3~5	5	3	3~5	3~5
酸素要求性*4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
増 殖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/50N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/50N*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N <sub>D</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*1: +はグラム陽性

\*2: +は芽胞である

\*3: +は芽胞陽性

\*4: +は酸素要求性である

\*5: (イ)はAM14A-2

(ロ)はAM37E

(ハ)はAM21B

(ニ)はAM9A-2

(ホ)はAM37F

(ヘ)はAM40A

(ト)はAM18B

(チ)はAM38C-1

(リ)はAM42E

表1-2 生化学的性状

	菌 株 名								
	AM14A-2	AM18B	AM38C-1	AM37E	AM9A-2	AM40A	AM37F	AM21B	AM42E
インドール	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ウレアーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブドウ糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マンニット	-	-	-	+	-	-	+	+	+
乳 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽 糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
サリシン	+	+	+	+	+	+	+	+	+
キシロース	-	-	-	+	+	+	+	+	+
アラビノース	-	-	-	+	-	-	+	+	+
ゼラチン	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エスクリン	+	+	+	+	+	+	+	+	+
グリセリン	-	-	-	-	-	-	-	+	+
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マンノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
メレジトース	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ソルビット	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	+	+
トレハロース	+	+	-	+	+	-	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表1-3 酵 素 活 性

菌 株 名	URE	BLTS	aARA	ONPG	aGLU	BGLU	aGAL	aFUC	NAG	PO4	LGY	GLY	PRO	PAL	ARG	SER	PYR	IND
AM9A-2	-	-	±	±	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM38C-1	-	-	±	±	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM40A	-	-	±	±	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM37F	-	-	-	-	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM42E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM14A-2	-	-	±	+	⊕	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM21B	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM37E	-	-	-	+	⊕	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM18B	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Rep ANA D System

(基 質)

URE Urea  
 BLTS p-Nitrophenyl-B, D-disaccharide  
 aARA p-Nitrophenyl-a, L-arabinoside  
 ONPG o-Nitrophenyl-B, D-galactoside  
 aGLU p-Nitrophenyl-a, D-glucoside  
 BGLU p-Nitrophenyl-B, D-glucoside  
 aGAL p-Nitrophenyl-a, D-galactoside  
 aFUC p-Nitrophenyl-a, L-fucoside  
 NAG p-Nitrophenyl-N-acetyl-B, D-glucosaminide  
 PO4 p-Nitrophenylphosphate  
 LGY Leucyl-glycine-B-naphthylamide  
 GLY Glycine-B-naphthylamide  
 PRO Proline-B-naphthylamide  
 PAL Phenylalanine-B-naphthylamide  
 ARG Arginine-B-naphthylamide  
 SER Serine-B-naphthylamide  
 PYR Pyrrolidonyl-B-naphthylamide  
 IND Tryptophane

(酵素活性)

β-Galactosidase  
 α-Glucosidase  
 β-Glucosidase  
 α-Fucosidase  
 Galactosidase  
 N-Acetylglucosaminidase  
 Alkaline phosphatase  
 Leucylglycine aminopeptidase  
 Glycine aminopeptidase  
 Proline aminopeptidase  
 Phenylalanine aminopeptidase  
 Arginine aminopeptidase  
 Serine aminopeptidase  
 Pyrrolidone aminopeptidase  
 Tryptophanase(indole production)

註: ⊕印は極めて強い



これらの各菌株の性状 (API 20A, Rap ANA II systemによる) より、AM21Bは*Clostridium beijerinckii*, AM37EとAM14A-2は*Clostridium butyricum*と同定された。AM38C-1, AM42E及びAM18Bの3菌株は*Clostridium*属と考えられるが、これまで知られていない新規な細菌である。さらに、AM37F, AM9A-2及びAM40Aの3菌株は、同定不能な全く新しい水素産生菌である。更に詳細に言えば、AM37F, AM9A及びAM40Aのように、グラム陽性、桿菌、無芽胞性嫌気性細菌で水素ガスを産生する細菌については、これまで全く報告されておらず、例をみないものである。これらの3菌株は、世界で初めて見出された新規細菌である。

これら菌株のガム寒天の高層斜面培地におけるガス産生性能を表1-4に示す。

表 1 - 4

ガム寒天の高層斜面培地におけるガス産生能

菌株名	好 気 培 養		嫌 気 培 養	
	増 殖	ガス産生	増 殖	ガス産生
AM 9A-2	-	-	+	+
AM 14A-2	-	+	+	+
AM 18B	-	+	+	+
AM 21B	-	+	+	+
AM 37E	-	+	+	+
AM 37F	-	+	+	+
AM 38C-1	-	+	+	+
AM 40A	-	+	+	+
AM 42E	-	+	+	+

ガム寒天の高層斜面培地を用いて36℃24時間培養

また、人工汚水におけるガス産生能を表1-5に示す。

表 1 - 5

人工汚水によるガス産生能

菌株名	人 工 汚 水 *							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
AM 9A-2	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 14A-2	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 18B	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 21B	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 37E	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 37F	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 38C-1	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 40A	-	±	+	±	+	+	+	+
AM 42E	-	±	+	±	+	+	+	+

\* (1) N: 普通ブイヨン(日水製薬製)

(2) NY: 0.5%イーストエキストラクト (日水製薬製) 加N

(3) ND: 0.3%グルコース加N

(4) PY: 0.5%ペプトンとイーストエキストラクト

(5) PYG: 1%グルコース加PY

(6) PYS: 1%澱粉加PY

(7) GAM: ガムブイヨン (日水製薬製)

(8) K-meet: クックドミート培地 (日水製薬製)

+は、ガス産生量がダーラム管の $\geq 1/2$ 程度

±は、ガス産生量がダーラム管の1/5程度

ガス産生量の測定は、添付図面第1図に示す装置を用いて行った。

すなわち、培養ビンの口を密栓したゴム栓に18号注射針を刺し通し、そこにビニールチューブをつなぎ、この排気管をガス測定用シリンダーに接続した。培養後、逆さにしたシリンダーに溜まったガス産生量を測定した。

前記したとおり、*Enterobacter aerogenes* E82005株の水素ガス産生能は246ml/ℓ・hrであるのに対し、本発明者がイエシロアリより分離に成功した前記の9菌株の水素産生能は、表1-6に示すようにE82005株と比較して全く比較にならないほど大量の水素ガスを産生し、従来菌に比してその10倍以上も産生する菌株も認められ、これらの菌株は工業的用途に充分使用可能であることが実証

された。

表1-6 水素ガス産生能

菌株名	水素ガス産生能 (ml H <sub>2</sub> /g・hr)	水素ガス産生指数
E.aerogenes E82005	246	1.0
AM37F	2,790	11.3
AM21B	2,515	10.2
AM38C-1	2,396	9.7
AM42E	2,380	9.7
AM18B	1,898	7.7
AM37E	1,815	7.4
AM9A-2	1,501	6.1
AM14A-2	1,478	6.0
AM40A	759	3.1

次に、上記の9菌株の糖分解能と糖分解系酵素活性をみると、非常に多様な活性を有していることが判明した(表1-2、表1-3参照)。

特に、上記の9菌株は、いずれも、 $\alpha$ -glucosidase活性及び $\alpha$ -galactosidase活性が強力であり、とりわけ、AM9A-2、AM37F、AM14A-2

及びAM37Eの4株の酵素活性は卓越していることが判明した。

これらの結果からして、糖を含有するないし糖を成分とする天然物を処理するに当って、これらの菌株は非常に有効であって、ジュース中各種農産物の清澄化、低粘化、流動化に利用することができるのみでなく、有機廃水、例えばビート工場やオレンジ加工工場その他パルプ植物繊維、澱粉あるいは多糖類などを含む腐液を処理するにあたって、これらの菌株は特に有効な細菌株であるといえることができ、腐液・廃棄物の処理による環境浄化に利用することができ、そして更に、水素ガスの製造の工業化においてこれらの菌株は極めて重要な役割を果たすものである。

本発明者らの見出した新規な水素ガス産生菌は、極めて速い反応速度で、かつ時間あたり極めて大量の水素ガスを産生するという画期的な特徴的性格を有するものであり、それとともに食品工業・製紙工業などに由来する廃水、あるいは生活廃水あるいはあらゆる有機物質廃棄物などの処理にと

っても極めて有効な細菌である。また、各種廃水を処理すると同時に水素ガスを産生させること、つまり廃水処理と水素ガスの産生とを同時に行うのにも、本発明に係る微生物は極めて有効に利用することができるのである。

次に本発明の実施例を示す。

#### 実施例1

グルコースをそれぞれ、0.3%及び1.0%加えた普通ブイヨン(日水製薬製)にAM21B菌(FERM P-11795)を接種し、第1図に示す装置を用いて、36℃の水相で培養し、発生する水素ガスの量を1時間毎に測定した。結果は表1-7に示すとおりであった。

表1-7 ガス発生量 (ml)

培養時間 (hr)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
1%グルコース ブイヨン	0	0	0	170	425	605	520	425	350	270	230	150	3145
0.3%グルコース ブイヨン	0	0	0	10	125	130	270	495	240	50	30	0	1350

## 実施例 2 人工汚水からの水素ガスの産生

0.3% グルコース加普通ブイヨン(日水製薬製)とガムブイヨン培地(日水製薬製)の各300mlに各菌を接種して、36℃で1夜静置培養した。産生されたガス量と水素ガス濃度より水素ガス産生量を算出した。結果は表1-8に示すとおりであった。

表 1-8

菌株名	ガス産生能(ml)		G/ND	ガス組成(%)		産生量(ml)		H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
	G培地	ND培地		H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	
AM38C-1	770	365	2.1	51.1	26.2	393	201	2.0
AM18B	860	360	2.4	40.2	19.9	357	171	2.2
AM9A-2	640	320	2.0	46.7	26.5	299	170	1.8
AM37F	730	355	2.0	40.7	18.0	297	131	2.3
AM37E	640	330	1.9	38.6	22.1	285	143	2.0
AM4ZE	630	250	2.5	44.4	16.2	280	102	2.8
AM21B	750	145	5.2	37.5	17.9	281	134	2.1
AM40A	600	230	2.6	42.5	21.7	255	130	2.0
AM14A-2	450	110	4.1	44.6	19.6	200	88	2.3

## 実施例 3 新規な水素ガス産生菌による水素ガス産生

人工汚水としてのガムブイヨン(日水製薬製)培地900mlに各培養菌液100mlを添加し攪拌して培養した。1時間毎にガス産生量、菌量(OD)、pH及び糖濃度を測定し、ガス産生量が200ml以上の場合のガスの組成分析を行った。ガス産生量とガス濃度から、水素ガスの産生量を算出し、培養時間と水素ガス産生量の関係を検討した。表1-9はその結果を示すものである。

表 1-9

培養時間(h)	ガス産生量(ml)		ガス組成(%)		産生量(ml)		菌量(OD)	pH	糖濃度(mg/dl)
	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス			
0	0	0	-	-	-	-	0.30	6.86	300
1	110	-	-	-	-	-	0.83	6.61	226
2	340	34.3	5.8	8.1	116	20	1.60	6.35	90
3	740	50.4	6.1	8.1	373	60	2.64	5.82	53
4	1280	61.5	22.4	22.4	762	269	3.68	5.40	18
5	800	45.2	27.9	27.9	362	223	4.33	5.40	18
6	200	28.2	49.9	49.9	56	100	4.40	5.37	14
Total	3380	-	-	-	1659	672	-	-	-
0	0	0	-	-	-	-	0.46	6.81	300
1	310	38.7	12.3	12.3	120	38	0.92	6.39	238
2	900	52.0	21.0	21.0	468	189	1.60	5.71	94
3	1200	60.1	30.8	30.8	726	370	3.00	5.32	45
4	470	42.2	30.7	30.7	198	144	3.20	5.24	45
5	70	-	-	-	-	-	3.20	5.24	45
6	60	-	-	-	-	-	3.20	5.24	45
Total	3010	-	-	-	1512	741	-	-	-
0	0	0	-	-	-	-	0.59	6.18	300
1	120	-	-	-	-	-	1.26	6.52	176
2	580	53.1	25.6	25.6	308	148	2.73	5.76	50
3	1440	56.6	34.1	34.1	815	491	3.80	5.30	30
4	380	52.8	31.9	31.9	201	121	4.38	5.07	30
5	180	-	-	-	-	-	4.38	5.07	30
6	60	-	-	-	-	-	4.38	5.07	30
Total	2760	-	-	-	1324	760	-	-	-

表 1-9 (続)

	培養時間 (h)	ガス発生量 (ml)	ガス組成(%)		発生量(ml)		pH	糖濃度 (mg/dl)
			H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス		
AM14A-2	0	0	—	—	—	—	0.49	6.62
	1	210	31.4	8.1	66	16	0.94	6.24
	2	760	56.3	20.7	423	157	1.84	5.50
	3	860	52.1	30.9	448	286	2.64	5.33
	4	770	32.7	20.6	252	157	2.64	5.10
	5	80	—	—	—	—	2.64	5.10
	6	20	—	—	—	—	2.64	5.10
AM14E	Total	2750	—	—	1194	596	—	—
	0	0	—	—	—	—	0.64	6.76
	1	120	—	—	—	—	1.32	6.46
	2	560	45.3	25.9	227	145	2.92	5.86
	3	1060	69.4	26.2	721	258	4.46	5.37
	4	560	40.6	24.4	127	137	5.00	5.21
	5	280	38.4	15.6	108	44	5.00	5.16
AM14A-2	6	110	—	—	—	—	5.00	5.16
	Total	2690	—	—	1183	584	—	—
	0	0	—	—	—	—	0.52	6.73
	1	180	—	—	—	—	1.26	6.42
	2	370	46.3	15.9	170	59	2.73	5.83
	3	456	53.1	26.3	239	118	3.28	5.59
	4	856	53.6	32.3	455	275	3.84	5.27
AM14A-2	5	356	48.0	31.4	173	113	3.84	5.20
	6	330	32.8	30.1	108	99	3.84	5.20
	Total	2540	—	—	1145	664	—	—

表 1-9 (続)

	培養時間 (h)	ガス発生量 (ml)	ガス組成(%)		発生量(ml)		pH	糖濃度 (mg/dl)
			H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス	H <sub>2</sub> ガス	CO <sub>2</sub> ガス		
AM18B	0	0	—	—	—	—	0.42	6.76
	1	80	—	—	—	—	0.68	6.64
	2	280	29.7	6.2	130	56	1.68	5.83
	3	530	50.7	28.7	267	152	2.37	5.47
	4	1100	52.3	33.4	575	367	2.70	5.21
	5	410	45.8	34.9	188	102	2.80	5.17
	6	1440	—	—	—	—	2.80	5.14
AM18A	Total	2540	—	—	1160	617	—	—
	0	0	—	—	—	—	0.26	6.81
	1	90	—	—	—	—	0.84	6.50
	2	310	40.5	11.3	126	35	2.08	5.73
	3	510	48.1	29.4	245	150	2.84	5.26
	4	440	51.6	28.7	230	131	3.10	5.12
	5	390	52.2	27.1	158	94	3.28	5.12
AM18E	6	280	33.4	24.1	94	76	3.28	5.12
	Total	2020	—	—	853	486	—	—
	0	0	—	—	—	—	0.78	6.73
	1	20	—	—	—	—	1.15	6.43
	2	80	—	—	—	—	2.00	5.95
	3	390	37.3	20.2	160	87	3.20	5.31
	4	1200	43.0	20.3	550	259	4.24	5.04
AM18E	5	210	33.1	24.6	56	42	4.24	5.01
	6	20	—	—	—	—	4.32	5.01
	Total	2000	—	—	766	348	—	—

## 手続補正書

平成 3年10月29日

## 〔発明の効果〕

以上述べたところから明らかなように、本発明に係るシロアリ由来の新規な水素ガス産生菌は、きわめて水素ガス産生能が高いのみでなく、有機物とりわけ単糖、少糖、多糖類等各種の糖類の分解能にもすぐれているという特徴を有するものである。

したがって、本発明に係る新規な水素ガス産生菌は、水素ガスの工業的製造法及び／又は廃水処理、廃棄物処理に有用な優れた活性を有し、産業上極めて価値ある微生物である。

## 4. 図面の簡単な説明

添付第1図は、本発明に係る新規微生物の水素ガス産生量を測定するために使用した装置の1例を示すものである。

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成 2年 特許願 第295383号

## 2. 発明の名称

水素ガス産生菌

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 神奈川県相模原市陽光台5-14-1  
氏 名 田 口 文 章 (ほか1名)

## 4. 代 理 人

住 所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号  
邦楽ビル503  
氏 名 井理士(7577) 戸 田 親 男  
電話 3508-0333

## 5. 補正により増加する請求項の数

なし

特許  
3.10.21

## 6. 補正の対象

受託証及び明細書

## 7. 補正の内容

- (1) 受託証2通を別紙のとおり補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。
- (3) 明細書10頁10～12行に

「同、第11795号……第11798号」

とあるを、

『微工研桑寄第 3592 号、微工研菌寄  
第 11800 号、微工研桑寄第 3593 号、  
微工研菌寄第 11798 号』

と補正する。

- (4) 明細書23頁9～10行に

「(FERM P-11795)」とあるを、

『(FERM BP-3592)』と補正する。

## 『2. 特許請求の範囲

- 1) シロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 2) 窒息死せしめたシロアリを寒天培地で固化した後これを嫌気性ガス雰囲気下で培養し、それから分離して得たことを特徴とする、請求項1のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 3) シロアリがイエシロアリ (Termites formosans) であり、寒天培地が酢酸塩及びギ酸塩を含有することを特徴とする、請求項2のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 4) クロストリジウム (Clostridium) 属に属するものであることを特徴とする、請求項1のシロアリ由来の水素ガス産生菌。
- 5) クロストリジウム (Clostridium) 属の菌学的性質を有するが芽胞形成能を欠くことを特徴とする微生物群に属する水素ガス産生菌。
- 6) 別掲表1-1、表1-2、表1-3に記載された一般的性状、生化学的性状および酵素活性を有する水素ガス産生細菌。

7) AM14A-2株(微工研菌寄第11793号)、AM37E株  
 (同、第11794号)、AM21B株(微工研条寄第3592  
号)、AM9A-2株(微工研菌寄第11800号)、AM37F  
 株(微工研条寄第3593号)、AM40A株(微工研菌寄  
 第11798号)、AM18B株(同、第11796号)、AM38C -  
 1株(同、第11797号) およびAM42E株(同、第118  
 01号)より選択される水素ガス産生細菌。』